

# 4

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
BORNSCHEUER et al. )  
Serial No. Unassigned )  
Filed: With Application )

jc518 U.S. PTO  
09/161680  
09/28/98

For: THE ALTERATION OF THE SUBSTRATE SPECIFICITY OF ENZYMES

Honorable Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

Sir:

CLAIM TO PRIORITY

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in Germany under the International (Paris) Convention for the Protection of Industrial Property (Stockholm Act July 14, 1967) is hereby requested and the right of priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed.

Germany: 197 43 683.8  
Filed : October 2, 1997

A certified copy of the priority document is attached.

Respectfully submitted,

KEIL & WEINKAUF

*H.B. Keil*

Herbert B. Keil  
Reg. No. 18,967  
Attorney for Applicants

1101 Connecticut Avenue, N.W.  
Washington, D.C. 20036  
(202) 659-0100  
HBK/lc



## Bescheinigung

jc518 U.S. PTO  
09/161680  
09/28/98

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen"

am 2. Oktober 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol C 12 N 15/63 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. September 1998  
Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag

*W. He*

W. He

Aktenzeichen: 197 43 683.8

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen,  
dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Arbeitsschritte  
durchführt:
- a) Einbringen einer DNA, die eine Kopie des für das Enzym  
kodierenden Gens enthält, in den Escherichia coli Stamm  
XL1 Red oder in ein funktionelles Derivat,
- b) Inkubation des transformierten Escherichia coli Stammes  
XL1 Red oder seines funktionellen Derivat zur Erzeugung  
von Mutationen im Enzymgen,
- c) Weitergabe der mutierten DNA aus dem Stamm XL1 Red oder  
seinem funktionellen Derivat an einen Mikroorganismus,  
der keine behindernde Enzymaktivität aufweist,
- d) Inkubation dieses Mikroorganismus zur Detektion der  
Enzymaktivität auf oder in mindestens einem Selektions-  
medium, das mindestens ein Enzymsubstrat, das die Er-  
kennung einer geänderten Substratspezifität des Enzyms  
ermöglicht, und ggf. weitere Indikatorsubstanzen enthält,
- e) Auswahl der Mikroorganismen, die eine Änderung der  
Substratspezifität zeigen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man  
die Arbeitsschritte (a) bis (e) mehrmals in einer Folge  
durchläuft, indem man die DNA aus den unter Schritt (e)  
ausgewählten Mikroorganismen wieder in den Stamm Escherichia  
coli XL1-Red oder seinem funktionellen Derivat zurückbringt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß als Mikroorganismen prokaryontische oder eukaryontische  
Mikroorganismen verwendet werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeich-  
net, daß als Mikroorganismen grampositive oder gramnegative  
Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeich-  
net, daß als Enzym eine Hydrolase verwendet wird.

## 2

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Enzym eine Hydrolase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Proteasen, Lipasen, Phospholipasen, Esterasen, Phosphatasen, Amidasen, Nitrilasen, Etherhydrolasen, Peroxidasen und Glykosidasen verwendet wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lipase, Esterase, Nitrilase oder Phytase verwendet.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Änderung der Substratspezifität zu einer selektiven enzymatischen Aktivität führt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Änderung der Substratspezifität zu einer regio-, chemo- oder stereoselektiven oder regio-, chemo- und/oder stereoselektiven enzymatischen Aktivität führt.

## Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen

## Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen.

- 10 Häufig steht der Synthesechemiker in der Praxis vor dem Problem, daß er leicht und einfach durchführbare Synthesewege zur Herstellung einer chemischen Verbindung nicht beschreiten kann, da dieser Weg zu Verbindungen führen würde, bei denen beispielsweise die Abspaltung einer benötigten Schutzgruppe nicht mehr möglich ist, da sonst das synthetisierte Molekül zerstört würde. Um  
15 dieses Problem zu lösen, muß er häufig einen umständlicheren, zeitaufwendigeren Syntheseweg einschlagen.

- Enzyme spalten chemische Bindungen unter milden Bedingungen. Sie können deshalb in einigen Fällen zur Lösung derartiger Syntheseprobleme verwendet werden, d.h. eine Schutzgruppe kann beispielsweise unter milden Bedingungen ohne Zerstörung anderer Bindungen und damit des Moleküls enzymatisch abgespalten werden. Enzyme ermöglichen so im Labor einen leichten und raschen Zugang zu den gewünschten Substanzen. Häufig reicht die enzymatische Aktivität und/oder Stabilität für eine technische Nutzung der Enzyme jedoch  
25 nicht aus, so daß die chemischen Synthesen, obwohl sie über eine größere Zahl von Synthesestufen durchgeführt werden müssen, trotzdem kostengünstiger sind und deshalb technisch realisiert werden.

- 30 Zur Verbesserung der enzymatischen Aktivität und/oder Stabilität wurden deshalb eine Vielzahl von Arbeiten unternommen. Dabei wurden unterschiedliche Wege verfolgt.

- Über die sogenannte "site directed mutagenesis" läßt sich die  
35 Stabilität und/oder enzymatische Aktivität der Enzyme sehr gezielt verbessern. Nachteilig bei der "site directed mutagenesis" von Enzymen ist, daß bei dieser Methode viel Wissen über die Struktur und Funktion der Enzyme aus Röntgenstrukturanalysen, aus dem Modelling, aus Vergleichen mit anderen Enzymen gleicher oder  
40 ähnlicher Spezifität vorhanden sein muß. Darüber hinaus muß die Sequenz der Strukturgene bekannt sein, um überhaupt eine zielgerichtete Verbesserung der Enzyme zu ermöglichen. In der Regel liegen diese Informationen nicht, noch nicht oder nur zum Teil vor, so daß in diesen Fällen diese Methode meist nicht zum gewünschten Erfolg führt, da nicht klar ist in welchen Bereichen  
45 das Enzym verändert werden muß. Liegen nur wenige Informationen über die enzymatische Aktivität vor, so sind Methoden, die zur

Verbesserung des Enzyms eine Zufallsstrategie verfolgen, zu bevorzugen, wobei diese Methoden trotzdem so zielgerichtet wie möglich sein sollten.

- 5 So wird von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777 - 778) eine PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese des nisZ-Gens von *Lactococcus lactis* beschrieben.
- 10 Die von Spee et al. beschriebene Methode wurde von Rellos et al. (Protein Expr. Purif., 5, 1994 : 270 - 277) weiter verbessert. Rellos et al. beschreiben die Mutagenese des Alkoholdehydrogenase-2-Gens von *Zymomonas mobilis* mit Hilfe einer PCR-Methode ohne Verwendung von dITP, da die Limitierung eines Nucleotids für
- 15 die Erhöhung der Mutationsrate und damit für den gewünschten Erfolg völlig ausreichend ist.

- Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747 - 10751) beschrieben. Durch diese
- 20 Rekombinationstechnik ließ sich die enzymatische Funktion des lacZ-Gens aus zwei mutierten und inaktivierten lacZ-Genen wieder herstellen.

- 25 Von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458 - 467) wird die Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode zur Steigerung der enzymatischen Aktivität einer Esterase gegenüber einem para-Nitrobenzylester beschrieben.

- 30 Von Nachteil bei den genannten Methoden ist, daß zur Erzeugung der Mutationen die DNA "in vitro" mit Enzymen wie der Taq-Polymerase und/oder Restriktionsenzymen und/oder Oligonukleotiden behandelt werden muß und die verschiedenen potentiellen Mutanten einzeln weiter behandelt und getestet werden müssen. Diese Methoden sind nur zur Mutagenese relativ kleiner DNA-Bereiche
- 35 geeignet.

- Ein weiterer Weg zur Mutagenese von Enzymen wird von Greener et al. in Methods in Molecular Biology (Vol. 57, 1996: 375 - 385) beschrieben. Greener et al. verwendet den speziellen *Escherichia*
- 40 *coli* Stamm XL1-Red zur Erzeugung von *Escherichia coli* Mutanten, die eine erhöhte Antibiotikaresistenz aufweisen. Diese erhöhte Antibiotikaresistenz ist auf eine erhöhte Kopienzahl des Plasmids pBR322, das für eine  $\beta$ -Lactamase kodiert, zurückzuführen. Auch zur Erzeugung auxotropher Mutanten und zur Erhöhung der Enzymaktivität
- 45 tät kann dieser *Escherichia coli*-Stamm verwendet werden.

Nachteil aller genannten Mutagenese-Methoden ist, daß nur vorhandene enzymatische Aktivitäten optimiert werden können. Sind neue enzymatische Reaktionen d.h. sind neue Substratspezifitäten der Enzyme gefragt, beispielsweise zur Spaltung eines neuen Substrats, so muß nach dieser neuen enzymatischen Aktivität zunächst in der belebten Natur in einem aufwendigen Screening gesucht werden. Anschließend muß das Enzym dann in der Regel noch weiter optimiert werden.

- 10 Es wäre deshalb wünschenswert eine Methode zu besitzen, die es ermöglicht neue enzymatische Aktivitäten zu generieren, das heißt die die Substratspezifität von Enzymen verändern kann.

15 Es war deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine neue breitanwendbare Methode zu entwickeln, die die oben genannten Nachteile nicht aufweist und die die Substratspezifität von Enzymen rasch und einfach ändern kann.

20 Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Arbeitsschritte durchführt:

- 25 a) Einbringen einer DNA, die eine Kopie des für das Enzym kodierenden Gens enthält, in den Escherichia coli Stamm XL1 Red oder in ein funktionelles Derivat,
- b) Inkubation des transformierten Escherichia coli Stammes XL1 Red oder seines funktionellen Derivat zur Erzeugung von Mutationen im Enzymgen,
- 30 c) Weitergabe der mutierten DNA aus dem Stamm XL1 Red oder seinem funktionellen Derivat an einen Mikroorganismus, der keine behindernde Enzymaktivität aufweist,
- 35 d) Inkubation dieses Mikroorganismus zur Detektion der Enzymaktivität auf oder in mindestens einem Selektionsmedium, das mindestens ein Enzymsubstrat, das die Erkennung einer geänderten Substratspezifität des Enzyms ermöglicht, und ggf. weitere Indikatorsubstanzen enthält,
- 40 e) Auswahl der Mikroorganismen, die eine Änderung der Substratspezifität zeigen, gelöst.

45 Unter Änderung der Substratspezifität im erfindungsgemäßen Verfahren ist zu verstehen, daß die Enzyme nach Durchlaufen des Verfahrens in der Lage sind Substrate umzusetzen, die sie vorher nicht umsetzen konnten, da die Affinität des Enzyms zum Substrat zu gering war (= hoher  $K_M$ -Wert) und/oder die Enzyme eine zu ge-

ringe katalytische Aktivität ( $= k_{cat}$ ) aufwiesen. In diesen Fällen ist der Quotient  $k_{cat}/K_M$  Null oder nahezu Null, das heißt es liegt keine Katalyse vor. Durch die Änderung der Substratspezifität wird der  $K_M$ -Wert verringert oder der  $k_{cat}$ -Wert erhöht oder beides, das heißt der Quotient  $k_{cat}/K_M$  wird größer Null. Es kommt zu einer katalytischen Reaktion. Das Enzym setzt das neue Substrat nach Mutagenese um.

Prinzipiell kann die Substratspezifität aller Enzyme verändert werden, bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren die Substratspezifität von Hydrolasen verändert. Hydrolasen bilden im Nomenklatorsystem der IUB die 3. Enzym-Klasse ( $= 3..$ ). Hydrolasen sind im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, da für sie in der Regel eine einfache Nachweisreaktion besteht und sie vielfach in technischen Synthesen Anwendung finden. Besonders bevorzugt wird die Substratspezifität von Hydrolasen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Proteasen, Lipasen, Phospholipasen, Esterasen, Phosphatasen, Amidasen, Nitrilasen, Etherhydrolasen, Peroxidasen und Glykosidasen verändert, ganz besonders bevorzugt werden Lipasen, Esterasen, Nitrilasen oder Phytasen.

Nach Änderung der Substratspezifität im erfindungsgemäßen Verfahren kann die Enzymreaktion ohne oder mit einer Selektivität bei chiralen Ausgangsverbindungen erfolgen, das heißt die Reaktion führt zu racemischen oder optisch aktiven Produkten. Bevorzugt werden Änderungen, die zu selektiven Änderungen in der Substratspezifität wie regio-, chemo- oder stereoselektiven oder zu regio-, chemo- und/oder stereoselektiven Reaktionen führen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren sind alle dem Fachmann bekannten Methoden zum Einbringen von DNA in Mikroorganismen geeignet (Verfahrensschritt a, Figur 1). Die DNA kann dabei über Phagen, über Transformation oder über Konjugation in den Stamm *Escherichia coli* XL1 Red oder eines funktionellen Derivats dieses Stammes eingebracht werden. Als vorteilhaft geeignete Phagen seien alle temperenten Phagen wie Lambda oder Mu genannt. Verfahren wie diese Phagen-DNA in die entsprechenden Mikroorganismen gebracht werden, sind dem Fachmann wohl bekannt (siehe Microbiology, Third Edition, Eds. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S., Harper International Edition, 1980). Bei der Konjugation kann die DNA direkt übertragen werden, das heißt sie ist auf dem konjugationsvermittelnden Plasmid lokalisiert wie beispielsweise auf dem F-Faktor, oder sie wird bei der Konjugation über einen komobilisierbaren Vektor übertragen. Auch diese Methoden sind dem Fachmann bekannt. Als bevorzugte Methode sei das Einbringen der DNA über Transformation genannt (Winnacker, E.L., From Genes to Clones, VCH, 1987: 126 - 127, Williams et al., Ann. Rev. Gen., Vol. 14, 1980: 41 - 76). In der Literatur sind zahl-



lose dem Fachmann bekannte Methoden zur Transformation von Mikroorganismen beschrieben, dabei werden verschiedenste Reagenzien wie PEG (Chung et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 1989: 2172 - 2175),  $\text{CaCl}_2$  (Mandel et al., J. Mol. Biol. Vol. 53, 1970: 159 - 162), Dimethylsulfoxid, Hexamincobalt und Dithiothreitol in Gegenwart von Mono- oder divalenten Kationen (Hanahan D., J. Mol. Biol., 166, 1983: 557 - 580) oder Elektroporation benutzt (siehe DNA Cloning 1, Ed. Clover et al., IRL Press, 1995, Hanahan et al., Technics for Transformation of E. coli, page 1-36, ISBN 0199634769).

Für die Transformation lassen sich alle üblichen Vektoren verwenden. Üblicherweise werden Vektoren, die sich in *Escherichia coli* replizieren lassen, verwendet. Soll als Selektionsmikroorganismus, der die Detektion der Enzymaktivität ermöglicht, ein Mikroorganismus eines anderen Reiches beispielsweise Pilze wie *Aspergillus*, *Ashbya* oder *Beauveria* oder Hefen wie *Saccharomyces*, *Candida* oder *Pichia*, einer anderen Familie beispielsweise *Actinomycetales* oder einer anderen Gattung *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* oder *Bacillus* verwendet werden, so werden vorteilhafterweise sogenannte "shuttle vektoren" verwendet, die sich in beiden Mikroorganismen replizieren lassen, da eine Umklonierung der DNA so nicht erforderlich ist.

Als Vektoren seien die folgenden Plasmide beispielhaft genannt pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI. Weitere Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung der Mutationen (Verfahrensschritt b, Figur 1) besonders geeignet ist der *Escherichia coli* Stamm XL1 Red (= *Epicurian coli* XL-1 Red), der von der Firma Stratagene La Jolla, CA vertrieben wird. Er trägt die folgenden Genmarker:  $\Delta[\text{mcrA}]183$ ,  $\Delta[\text{mcrCB-hsdSMR-mrr}]173$ , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *mutS*, *mutT*, *mutD5*, *lac*. *mutS* ist eine Mutation im sog. "mismatch repair pathway", *mutT* ist eine Mutation im "oxo-dGTP repair pathway" und *mutD5* ist eine Mutation in der 3'-5' Exonucleaseuntereinheit der DNA Polymerase III. Kompetente Zellen dieses Stammes können von Stratagene unter der Bestellnummer 200129 gekauft werden. Unter einem funktionellen Derivat dieses Stammes sind vorzugsweise *Escherichia coli* Stämme zu verstehen, die folgende Genmarker *relA1*, *mutS*, *mutT* und *mutD5* enthalten. Diese Genmarker führen in den Organismen zu einer deutlich erhöhten Mutationsrate. Sie sollten

deshalb auf Agarplatten oder in einem Anzuchtmedium nicht zu lange inkubiert werden, da sie sonst ihre Vitalität verlieren.

Zur Detektion der veränderten Substratspezifität (= Mutationen im verwendeten Enzym) kann die DNA zunächst vorteilhafterweise, im Falle das Vektoren verwendet wurden, aus dem E. coli Stamm XL1 Red oder seinem funktionellen Derivat isoliert und in einen Mikroorganismus, der keine entsprechende Enzymaktivität aufweist, eingebracht (Verfahrensschritt c, Figur 1) werden. Wird beispielsweise eine Esterase in diese Selektionsorganismen eingebracht, so dürfen diese Mikroorganismen keine Esteraseaktivität aufweisen, die den für die Selektion auf eine Änderung der Substratspezifität der Esterase verwendeten Ester spalten. Andere Esteraktivitäten in diesem Organismus stören die Selektion nicht. Das Einbringen der DNA kann wie oben beschrieben über Phagen bzw. Viren, über Konjugation oder über Transformation erfolgen. Im Falle des Einbringens über Phagen bzw. Viren oder über Konjugation ist ein spezielles Isolieren der DNA nicht erforderlich. Die DNA kann direkt über Konjugation oder über den Phagen bzw. Virus in den für die Selektion verwendeten Mikroorganismus eingebracht werden. Die Weitergabe der DNA erfolgt also in diesen Fällen ohne ein Isolieren der DNA, im Falle der Verwendung von Vektoren über eine Transformation. Auch die DNA der Mikroorganismen, die eine veränderte Substratspezifität nach Selektion aufweisen, kann ohne Isolierung über Konjugation oder Phagen bzw. Viren oder über Transformation in den Stamm E. coli XL1 Red oder einem funktionellen Derivat für eine weitere Selektionsrunde eingebracht werden (= Figur 1, gestrichelte Linie). Auf diese Weise kann das erfindungsgemäße Verfahren ein oder mehrmals in Folge durchlaufen werden. Die DNA wird dabei aus den E. coli Stämmen XL1 Red oder dessen funktionellen Derivaten an die Selektionsorganismen weitergegeben und gelangt schließlich für eine neue Selektionsrunde wieder zurück in die E. coli Stämme.

Als Selektionsmikroorganismen im erfindungsgemäßen Verfahren sind prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Mikroorganismen geeignet, wobei sie keine enzymatische Aktivität aufweisen dürfen, die die Selektion behindern könnte. Darunter ist zu verstehen, daß entweder keine enzymatische Aktivität in den Mikroorganismen vorliegt, nach der gesucht wird, das heißt das oder die zur Selektion der veränderten Substratspezifität verwendeten Substrate durch die Enzyme der Selektionsmikroorganismus nicht umgesetzt werden, oder das nur eine geringe entsprechende enzymatische Aktivität in den Mikroorganismen vorliegt, die eine Selektion noch ermöglicht. Als Mikroorganismen kommen für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft grampositive oder gramnegative Bakterien, Pilze oder Hefen in Frage. Bevorzugt werden grampositive Bakterien wie Bacillus, Rhodococcus, Streptomyces oder

Nocardia oder gramnegative Bakterien wie Salmonella, Pseudomonas oder Escherichia verwendet. Ganz besonders bevorzugt werden Escherichia coli Stämme verwendet. Wobei die Gattung und Art oder die Zugehörigkeit zu einer Familie oder einem Reich des für die Selektion verwendeten Mikroorganismus von untergeordneter Rolle ist, soweit er eine Selektion der veränderten Substratspezifität ermöglicht.

Für die Selektion der veränderten Substratspezifität werden die Mikroorganismen zur Detektion der Enzymaktivität auf oder in mindestens einem Selektionsmedium, das mindestens ein Enzymsubstrat, das die Erkennung einer geänderten Substratspezifität des Enzyms ermöglicht, inkubiert (Figur 1, Verfahrensschritt d). Dieses Selektionsmedium kann gegebenenfalls weitere Indikatorsubstanzen enthalten, die eine bessere Erkennung der gewünschten Änderung ermöglichen. Solche zusätzlichen Indikatorsubstanzen können beispielsweise pH-Indikatoren sein.

Figur 1 gibt die einzelnen Schritte des Verfahrens beispielhaft unter Verwendung eines Vektors (1) wieder. Verfahrensschritt a zeigt das Einbringen der DNA (2) über den Vektor in den Stamm Escherichia coli XL1 Red oder in ein funktionelles Derivat (3) dieses Stammes. Die DNA des Enzyms wird in diesen Organismen mutiert [Sterne in Figur 1 deuten beispielhaft die Mutationen in der DNA (2) schematisch an]. Die mutierten Vektoren (4) werden anschließend wieder aus dem Stamm Escherichia coli XL1 Red oder seinen funktionellen Derivaten isoliert und anschließend direkt oder nach einer Lagerung in die Selektionsorganismen (5) transformiert (Verfahrensschritt c). Diese Organismen werden schließlich auf mindestens einem Selektionsmedium (6) ausplattiert und so die veränderte Enzymsubstratspezifität über beispielsweise einen Wachstumsassay und/oder einen visuellen Assay identifiziert (Verfahrensschritt d). Positive Klone, die eine veränderte Substratspezifität aufweisen, werden schließlich ausgesucht und das mutierte für das veränderte Enzym kodierende Gen kann isoliert werden (Verfahrensschritt e). Das Verfahren kann unter Verwendung des mutierten Gens mehrfach wiederholt werden [Figur 1, gestrichelte Linie (7)].

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die verwendeten Mikroorganismen, das heißt der Escherichia coli XL1 Red Stamm sowie seine funktionellen Derivate sowie die verwendeten Selektionsorganismen in einem Medium, das das Wachstum dieser Organismen ermöglicht angezüchtet. Dieses Medium kann ein synthetisches oder ein natürliches Medium sein. Je nach Organismus werden dem Fachmann bekannte Medien verwendet. Für das Wachstum der Mikroorganismen enthalten die verwendeten Medien eine Kohlenstoff-

quelle, eine Stickstoffquelle, anorganische Salze und gegebenenfalls geringe Mengen an Vitamine und Spurenelemente.

Vorteilhafte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Zucker wie  
5 Mono-, Di- oder Polysaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Xylose, Galaktose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose, komplexe Zuckerquellen wie Melasse, Zuckerphosphate wie Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckeralkohole wie Mannit, Polyole wie Glycerin, Alkohole  
10 wie Methanol oder Ethanol, Carbonsäuren wie Citronensäure, Milchsäure oder Essigsäure, Fette wie Sojaöl oder Rapsöl, Aminosäuren wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure oder Aminosucker, die auch gleichzeitig als Stickstoffquelle verwendet werden können.

15 Vorteilhafte Stickstoffquellen sind organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispiele sind Ammoniumsalze wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Nitrate, Harnstoff, oder komplexe Stickstoffquellen wie Maisquellwasser, Bierhefeautolysat, Sojabohnenmehl, Weizengluten, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Caseinhydrolysat, Hefe oder Kartoffelprotein, die häufig auch gleichzeitig als Stickstoffquelle dienen  
20 können.

Beispiele für anorganische Salze sind die Salze von Calcium, Magnesium, Natrium, Mangan, Kalium, Zink, Kupfer und Eisen. Als  
25 Anion dieser Salze sind besonders das Chlor-, Sulfat- und Phosphation zu nennen.

Gegebenenfalls werden dem Nährmedium weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, wie beispielsweise Vitamine oder Wachstumsförderer wie  
30 Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenat oder Pyridoxin, Aminosäuren wie Alanin, Cystein, Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Serin, Methionin oder Lysin, Carbonsäuren wie Citronensäure, Ameisensäure, Pimelinsäure oder Milchsäure, oder Substanzen wie Dithiothreitol.

35 Zur Stabilisierung der DNA, die in den Vektoren oder Phagen enthalten ist, in den Zellen können gegebenenfalls Antibiotika dem Medium zugesetzt werden.

40 Das Mischungsverhältnis der genannten Nährstoffe hängt von der Art der Inkubation (= Fermentation) ab und wird im Einzelfall festgelegt. Die Mediumkomponenten können alle zu Beginn der Fermentation vorgelegt werden, nachdem sie falls erforderlich getrennt sterilisiert oder gemeinsam sterilisiert wurden, oder  
45 aber je nach Bedarf während der Inkubation nachgegeben werden.

Plattenmedien sind gegenüber Flüssigmedien bevorzugt, da sie eine leichtere Detektion der gewünschten Änderung der Substratspezifität ermöglichen. Wichtig ist, daß keine Mediumskomponenten verwendet werden, die die Detektion der veränderten Enzymaktivität 5 stören könnten.

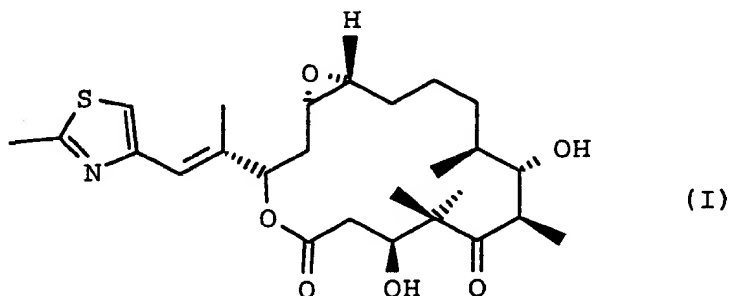
- Die Züchtungsbedingungen werden so festgelegt, daß die Organismen (= *Escherichia coli* Stamm XL1 Red und Selektionsorganismen) optimal wachsen und daß die bestmöglichen Ausbeuten erreicht werden.
- 10 Bevorzugte Züchtungstemperaturen liegen bei 15 °C bis 40 °C. Besonders vorteilhaft sind Temperaturen zwischen 25 °C und 37 °C. Vorzugsweise wird der pH-Wert in einem Bereich von 3 bis 9 festgehalten. Besonders vorteilhaft sind pH-Werte zwischen 5 und 8. Im allgemeinen ist eine Inkubationsdauer von 1 bis 240 Stunden, 15 bevorzugt von 5 bis 170 Stunden, besonders bevorzugt von 10 bis 120 Stunden ausreichend, in einzelnen Fällen können zur Mutagenese oder Detektion auch längere Inkubationsdauern erforderlich sein.
- 20 Die veränderte Substratspezifität kann nach Identifizierung der entsprechenden Klone nochmals vorteilhaft in einem "in vitro" Assay nachkontrolliert werden.

#### Beispiele:

- 25 Für die Synthese des Macrolidantibiotikums Epothilon A (siehe Formel I) erwiesen sich die 3-Hydroxyester [siehe Formel II, (1) und (3)] in der retrosynthetischen Betrachtung als günstige Ausgangsverbindung.

30

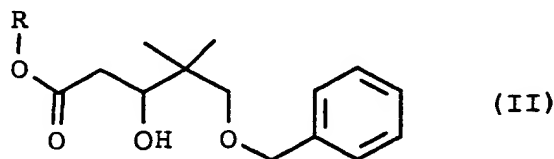
35



40

- 1: R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
3: CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH

45



## 10

Für die optisch aktive Herstellung der Verbindungen wurde ein enzymatischer Weg mit Hilfe von Esterasen bzw. Lipasen eingeschlagen. Überraschenderweise zeigte keine der verwendeten 18 Lipasen und zwei Esterasen eine enzymatische Aktivität gegen-  
 5 über den 3-Hydroxyestern (siehe Tabelle I). Weder in der Hydro-  
 lyserichtung, die in einem Phosphatpuffer durchgeführt wurde,  
 noch in der Syntheserichtung, die mit Vinylacetat in Toluol  
 durchgeführt wurde, konnte eine enzymatische Aktivität nach-  
 gewiesen werden.

10

Tabelle I: Getestete Lipasen und Esterasen - Hydrolyse des  
 Ethylesters (II, 1)

	Enzym aus	Hersteller
15	<i>Pseudomonas cepacia</i> (= PS)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Pseudomonas cepacia</i> (= AH)	Amano, Nagoya, Japan
	Acylase (ACS)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Rhizopus delamar</i> (D)	Amano, Nagoya, Japan
20	<i>Rhizopus javanicus</i> (F-AP 15)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Candida rugosa</i> (AY)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Mucor javanicus</i> (M)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Penicillium roquefortii</i> (R)	Amano, Nagoya, Japan
25	<i>Penicillium cyclopium</i> (G50)	Amano, Nagoya, Japan
	<i>Chromobacterium viscosum</i> (crude)	Toyo Jozo, Tokyo, Japan
	<i>Chromobacterium viscosum</i> (pure)	Toyo Jozo, Tokyo, Japan
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biocatalysts Ltd. Ponty- bridd, UK
30	<i>Humicola lanuginosa</i>	Biocatalysts Ltd. Ponty- bridd, UK
	<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme, im- mob.)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
35	<i>Candida antartica</i> B (SP435, immob.)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
	<i>Candida antartica</i> B (SP525, frei)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
	<i>Candida antartica</i> A (SP526, frei)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
	<i>Candida antartica</i> A,B (SP382, frei)	Novo, Bagsvaerd, Dänemark
40	Schweineleberesterase	Fluka, Buchs, Schweiz
	Esterase aus <i>Thermoanaerobium brok- kii</i>	Fluka, Buchs, Schweiz

Um eine Umsetzung dieser Verbindungen (II) zu ermöglichen, wurde  
 45 deshalb eine Mutagenesestrategie ausgehend von einer Esterase aus  
*Pseudomonas fluorescens*, die in *E. coli* kloniert worden war,  
 eingeschlagen. Die Klonierung und Sequenzierung dieser Esterase

wurde zuerst von Choi et al. (Agric. Biol. Chem. Vol. 54, No. 8, 1990: 2039 - 2045) beschrieben. Pelletier und Altenbuchner (Microbiology, Vol. 141, 1995: 459 - 468) haben diese Esterase nochmals sequenziert und einige Fehler in der ursprünglichen 5 Sequenz von Choi et al. gefunden.

Für die Mutagenese der Esterase wurde der Stamm *Escherichia coli* XL-1 Red (= *Epicurian coli* XL-1 Red) verwendet.

## 10 1. Herstellung der Esterase bzw. der mutierten Esterasen

Der Stamm *Escherichia coli* JM109 oder DH5 $\alpha$ , der das Rhamnose induzierbare Plasmid 2792.1 (siehe Figur 2) trägt, wurde bei 37 °C in Luria-Bertani (= LB)-Medium, das mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin supplementiert war, bis zur frühen exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> 0,5 - 0,6, ca. 3 Stunden) angezogen. Auf dem Plasmid 2792.1 ist das Esterasegen *estF* lokalisiert. Die Genexpression wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von Rhamnose [Endkonzentration 0,2 % (w/v)] zur Kultur induziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3,5 Std. bei 37 °C inkubiert und über Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, 4 °C) geerntet und zweimal mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5, 4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Puffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4 °C) entfernt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des Bicinchonionic acid-Proteinbestimmungskits der Firma Pierce, Rockford, Illinois, USA (Bestellnummer 23223, US 4,839,295) ermittelt. Die spezifische Aktivität der PFE wurde photometrisch oder in einem pH-Stat (siehe 2. Esteraseaktivität) bestimmt. Die PFE wurde direkt in den Hydrolyseexperimenten verwendet. Weitere Aufreinigung der PFE für die Hydrolyseexperimente erfolgte nicht, da die Esterase schon in hoher Reinheit von den Stämmen produziert wurde. Eine einfache Reinigung über eine Zinc-Affinitätschromatographie führte zu einer homogenen Esteraselösung. Dabei wurde die spezifische Aktivität nur geringfügig angehoben.

## 2. Bestimmung der Esteraseaktivität

Die Esteraseaktivität wurde in einem pH-Stat-Assay mit 5 % (w/v) Ethylacetat in einer Emulsion, die neben destilliertem Wasser 2 % (w/v) Gummi Arabicum enthält, bei 37 °C und pH 7,5 bestimmt. Zu 20 ml dieser Emulsion wurde eine bekannte Menge Esterase gegeben. Die freigesetzte Essigsäure wurde automatisch in einem pH-Stat-Automat der Firma Metrohm (Herisau, Schweiz) mit 0,1 N NaOH titriert, so daß der pH konstant

blieb. Die Esteraseaktivität wurde in Unit angegeben. Unter ein Unit (= U) versteht man die Menge an Enzym, die 1  $\mu\text{mol}$  Essigsäure pro Minute unter Assaybedingungen produziert. Die ermittelten Unit-Werte wurde mit dem Wert der Autolyse von Ethylacetat unter diesen Bedingungen korrigiert. Dieser Wert beträgt 0,25  $\mu\text{mol}$  pro Minute bei 37 °C.

### 3. Biotransformation

Die Hydrolyse der 3-Hydroxyester wurde in Rundkolben unter Rühren (700 rpm) durchgeführt. Dazu wurden 0,5 mmol des Esters 1 oder 3 zu einem Milliliter Toluol bei 37 °C gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Kulturüberstand gestartet und durch Extraktion mit Ether gestoppt. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Die Substrate und das Produkt wurde mit Hilfe einer Kieselgelsäule (Petrol-ether : Ether, 2 : 1) getrennt.

Für die Analysen der Reaktionsprodukte wurden 100  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisches zentrifugiert und der Überstand mittels Dünnschicht (Kieselgelplatten, sichtbar machen mit UV oder ansprühen mit Cer-Reagenz) oder GC (Hewlett Packard, Model HP5890 Series II) unter Verwendung einer chiralen Säule [=Heptakis, (6-O-thexyldimethyl-silyl)-2,3-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, 25 x 0,25 mm, 15 m, Prof. W. König, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Deutschland] analysiert. Die GC-Analyse wurde bei 125 °C (isothermal) mit Helium als Trägergas (80 kPa), einem Flammenionisationsdetektor und einem sog. "split ratio" von 1 : 100 durchgeführt.

### 4. Anzucht der Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen (Mutagenesestamm: *Escherichia coli* XL-1 Red, Selektionsstamm: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ) wurden in LB-Medium (= Luria-Bertani-Medium), LB/Amp-Medium [LB supplementiert mit Ampicillin (1 % w/v)], LB/TB/Amp-Medium [LB supplementiert mit Tributyrin (1 % v/v) und Ampicillin (1 % w/v) und 1 % Agar] und MM/Amp/Ind/Rha [Minimal-medium supplementiert mit Ampicillin (1 % w/v) und als Indikatorsubstanzen Kristallviolett (1 mg/l) und Neutralrot (30 mg/L) und zur Induktion Rhamnose (0,2 % w/v) sowie 1 % Agar] angezogen. Die Zusammensetzung des LB-Mediums sowie des Minimalmediums (M9) sind Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sec. Edition, Vol. I, II, III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ISBN 0-87969-309-6) oder



Greener et al. (Methods in Molecular Biology, Vol. 57, 1996: 375 - 385) zu entnehmen.

## 5. Mutagenese

5

Die Mutagenese wurde wie in Figur 1 dargestellt durchgeführt. Das Plasmid PFE-WT wurde aus einer LB/Amp-Medium Übernachtskultur mit Hilfe eines Kits von der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) isoliert und anschließend zur Mutagenese in kompetente Zellen des Stammes Epicurian coli XL-1 Red transformiert und über Nacht in 50 ml LB/Amp-Medium, das mit 20 mM  $MgCl_2$  und 20 mM Glukose supplementiert war, bei 37 °C angezogen. 500 µl dieser Kultur wurden in frisches LB/Amp-Medium (50 ml) geimpft und einem weiteren Mutationszyklus unterzogen. Von der restlichen Kultur wurden 2 ml Zellen genommen, zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Plasmid aus diesen Zellen isoliert (siehe Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sec. Edition, Vol. I, II, III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ISBN 0-87969-309-6). Es wurden bis zu sieben Mutationszyklen nacheinander durchgeführt. Positive Mutanten, die in der ersten Runde identifiziert wurden (z.B. PFE-U3) wurden einer zweiten Mutageneserunde (bis zu sieben Zyklen) unterzogen.

## 25 6. Transformation der Mikroorganismen

Die Transformation der Mikroorganismen E. coli XL1 Red oder E. coli DH5α wurde nach der von Chung et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 1989: 2172 - 2175) beschriebenen Methode durchgeführt. Nach Anzucht der Transformanten über ca. 1 Stunde in LB/Amp-Medium bei 37 °C wurden Aliquots (50 - 100 µl) der Kultur auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Platten wurden als Masterplatten für das anschließende Stempeln nach Lederberg in den Screening-Experimenten verwandt (Manual of Methods General Bacteriology, American Society For Microbiology, Washington, DC 20006, ISBN 0-914826-29-8). Zusätzlich wurden 50 µl Kultur auf LB/TB/Amp-Platten, die 0,2 % Rhamnose enthielten, zur Identifizierung von Kolonien, die eine aktive Esterase produzieren, ausplattiert.

## 7. Screening System

Zur Identifizierung der mutierten Gene wurden die Kolonien von den Masterplatten in einem Replicaplatting auf folgende Selektionsplatten gestempelt (Manual of Methods for General Bacteriology, American Society For Microbiology, Washington,

DC 20006, ISBN 0-914826-29-8): a) MM/Amp/Ind/Rha mit 0,1 %  
(w/v) Substrat (Verbindung 1), b) MM/Amp/Ind/Rha mit 0,1 %  
(w/v) Substrat (Verbindung 3). Die Platten wurden bei 37 °C  
5 inkubiert. Positive Klone wurden anhand der roter Färbung  
um und in den Kolonien - Senkung des pH-Wertes - auf den  
Plattentypen (a) und (b) und schnelleres Wachstum auf den  
(b)-Platten identifiziert. Auf LB/Amp/Ind-Platten ist bei  
alle Kolonien nach 2 Tagen eine Rotfärbung zu beobachten.  
Dies ist vermutlich auf eine Nebenreaktion zurückzuführen.  
10 Für die Tests sind deshalb nur die oben genannten Minimal-  
mediumsplatten geeignet. Durch Vergleich mit den Master-  
platten wurden nur solche Kolonien ausgewählt, die in beiden  
Methoden ein positives Ergebnis lieferten, das heißt sowohl  
eine intakte Esterase produzierten, als auch Rotfärbung auf-  
15 wiesen. Unter ca. 750 Kolonien der ersten Mutageneserunde  
wurden zwei positive Klone (= PFE-U1 und PFE-U3) nach 2 bis 6  
Tagen Inkubation bei 37 °C identifiziert. Im Falle von PFE-U1  
bildete sich nur eine schwache Rotfärbung, während im Falle  
von PFE-U3 sich eine starke Rotfärbung bildete und auf  
20 Verbindung 3 sich ein gutes Wachstum zeigte. Die Vektoren  
(= Plasmide) dieser Klone wurden isoliert und erneut in den  
Stamm E. coli DH5α transformiert. Diese Organismen wurden zur  
Produktion der mutierten Esterasen nach Rhamnoseinduktion in  
250 ml LB/Amp-Medium verwendet. Die Esterase (siehe oben)  
25 wurde isoliert und zur präparativen Umsetzung der Ver-  
bindung 1 verwendet. Als Kontrolle wurde die nicht mutierte  
Wildtyp-Esterase verwendet.

#### 8. Nucleotidsequenz-Analyse

30 Die Nucleotidsequenz der Esterasegene wurde unter Verwendung  
einer Fluoreszenz-Dideoxy-DNA-Sequenzmethode bestimmt. Die  
DNA-Sequenzierung wurde mit dem Taq Dye Deoxy™ Cycle Sequen-  
cing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) nach  
35 Angaben des Herstellers unter Verwendung von Primern, die von  
der Nucleinsäuresequenz abgeleitet wurden (Interactiva, Ulm,  
Germany), durchgeführt. Die Sequenzierung des PFE-U1-Gens  
ergab keine Mutation im Strukturgen, während die Sequenz von  
PFE-U3 zwei Punktmutationen aufwies. In Position 209 (A gegen  
40 D) und in Position 181 (L gegen V) fand dadurch ein Amino-  
säureaustausch statt. Modelling-Analysen zeigten, daß die  
Aminosäureaustausche weit entfernt vom Aktiven Zentrum  
liegen.

## 9. Chemische Synthese der Verbindungen 1 und 3

a) 5-(Benzyloxy)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäureethyl-  
ester (= Verbindung 1)

5 Zu einer Lösung von 170 ml Lithiumdiisopropylamid (110  
mmol, hergestellt aus 11,1g Diisopropylamin und 68,8 ml  
Butyllithium, 1,6 N in Hexan) in THF/Hexan wurde bei  
- 60 °C eine Essigsäureethylesterlösung (8,8 g, 100 mmol  
in 10 ml THF) tropfenweise zugegeben. Nach 30 Minuten  
10 wurden 30 ml 3-Benzyloxy-2,2-dimethylpropanal (19,2 g,  
100 mmol) in THF rasch zugegeben, der Ansatz 5 Minuten  
gerührt, bevor eine wässrige Kaliumhydrogensulfatlösung  
zur Neutralisierung zugegeben wurde. Der Reaktionsansatz  
wurde mit Diethylether extrahiert, mehrmals mit Wasser  
15 gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das  
organische Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Es wurden  
26,1 g (93 %) der Verbindung als leicht gelbes Öl  
isoliert. Die Verbindung wurde über eine Kieselgelsäule  
(Ether : Petrolether, 1:3 bis 1:1) gereinigt.  
20 <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.90 (s, CH<sub>3</sub>), 0.93 (s, CH<sub>3</sub>), 1.25 (t, J =  
7 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.37 (dd, J = 16 Hz, J = 10 Hz, 1H), 2.49  
(dd, J = 16 Hz, J = 4 Hz, 1H), 3.28 (d, J = 9 Hz, 1 H),  
3.36 (d, J = 9 Hz, 1H), 3.55 (d, J = 4 Hz, OH), 4.02 (dt,  
J = 10 Hz, , J = 4 Hz, 1H), 4.16 (q, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.49  
25 (s, BnCH<sub>2</sub>), 7.30 (m, 5 Aryl-H)ppm. <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ =  
14.16, 19.78, 22.10, 37.23, 38.15, 60.50, 73.42, 74.00,  
78.44, 127.57, 128.34, 138.05, 173.15 ppm. IR (cap.  
film): ν = 3500 (broad), 3064, 3028, 2976, 2936, 2904,  
2872, 1732, 1476, 1452, 1368, 1308, 1256, 1184, 1156,  
30 1096 cm<sup>-1</sup>. MS(RT): m/e = 280 (0,5 M<sup>+</sup>), 234(1), 205(1),  
190(3), 174(1), 159(2), 156(1), 141(4), 117(9), 111(3),  
109(6), 108(13), 107(16), 91(100), 79(10), 71(12).

b) 5-(Benzyloxy)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäure-2',3'-  
dihydroxypropylester (= Verbindung 3)

35 Entsprechend der unter a beschriebenen Synthese wurde  
unter Verwendung von 35 mmol Lithiumdiisopropylamid,  
30 mmol 1-Acetyl-2,3-isopropylidenglycerin und 30 mmol  
3-Benzyloxy-2,2-dimethylpropanal die Verbindung 5-(Ben-  
zyloxy)-3-hydroxy-4,4-dimethyl-pentansäure-(2',2'-di-  
40 methyl-1,3-dioxolan)-4'-ylmethylester (= Verbindung 2)  
synthetisiert. Ausgehend von 3,66 g (10 mmol) dieser Ver-  
bindung in 30 ml Methoxyethanol wurde die Verbindung 3  
synthetisiert. Die Lösung der Verbindung 2 wurde mit  
45 5,0 g Borsäure auf 110 °C für 20 Minuten erhitzt. Nach  
Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit  
geringen Mengen an Wasser versetzt und mit Diethylether

## 16

extrahiert. Der Extrakt wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und die Verbindung 3 über eine Kieselgelchromatographie (Ether und Ether : Dioxan, 9 : 1) gereinigt. 2,3 g (70 %) der Verbindung 3 wurden als farbloses Öl in einem 1 : 1 Diastereomerengemisch isoliert.

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  = 0.90 (s,  $\text{CH}_3$ ), 0.92 (s,  $\text{CH}_3$ ), 2.40 (m, 1H), 2.59 (m, 1H), 3.24 (d,  $J$  = 9 Hz, 1 H), 3.33 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 3.56 (m,  $\text{CH}_2$ ), 3.84 (quint,  $J$  = 5 Hz, 1H), 3.99 - 4.22 (sev. m, 3H), 4.45 (d,  $J$  = 12 Hz, 1H), 4.51 (d,  $J$  = 12 Hz, 1H) 7.31 (m, 5 Aryl-H)ppm.  $^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ :  $\delta$  = 21.00, 21.63, 38.52, 39.82, 64.00, 64.02, 66.64, 66.68, 71.08, 71.10, 74.07, 74.35, 78.21, 128.56, 128.67, 129.35, 139.94, 174.41 ppm. IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu$  = 3600 (broad), 3436 (broad), 3088, 3064, 3000, 2964, 2876, 1732, 1600, 1452, 1412, 1384, 1364, 1308, 1284, 1256, 1228, 1180, 1156, 1088, 1052  $\text{cm}^{-1}$ . MS (140 °C):  $m/e$  = 326(0.5,  $\text{M}^+$ ), 308(1), 235(4), 202(5), 188(3), 174(3), 163(9), 145(19), 108(19), 107(11), 91(100), 71(12).

## 10. Enzymatische Hydrolyse mit PFE-U3

Die enzymatische Hydrolyse von der racemischen Verbindung 1 mit der mutierten Esterase PFE-U3 führte zur korrespondierenden Säure  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11,01^\circ$  ( $c$  = 0,965,  $\text{CHCl}_3$ ), Öl, 11,6 %  $\gamma$  und dem verbliebenen Startmaterial (24,9 % ee),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0,97^\circ$  ( $c$  = 3,071,  $\text{CHCl}_3$ ), Öl, 61,4 %  $\gamma$ . Die Hydrolyse erfolgte also mit einer stereoselektiven Diskriminierung von 1. Die Wildtypthydrolase als Kontrolle ebenso wie die Mutante PFE-U1 ist nicht in der Lage die Verbindung 1 umzusetzen. Mutanten der zweiten Generation ausgehend von PFE-U3 zeigten keine Verbesserung in der Stereoselektivität in der Hydrolysereaktion. Mutanten der zweiten Generation sind PFE-3-311 bis PFE-3-713 (siehe Tabelle II). Tabelle II gibt die spezifische Aktivität der verschiedenen Esterasen in Units mit Essigsäureethylester als Substrat wieder (Tabelle II, U/mg Protein). Die optische Aktivität der verschiedenen Esterasen bezieht sich auf die Verbindung 1 (siehe Tabelle II).

Tabelle II: Substratspezifität verschiedener Esterasen

5	Esterase	Aktivität (U/mg) gegen Ethylacetat	Enantiomerenüberschuß (%ee bezogen auf Verbindung 1)
	PFE-WT	6,0	0
	PFE-U1	4,9	0
	PFE-U3	2,3	24,9
10	PFE-U3-311	0,9	3,3
	PFE-U3-411	1,3	7,0
	PFE-U3-412	2,1	3,7
	PFE-U3-413	2,5	3,5
15	PFE-U3-511	0,9	3,3
	PFE-U3-512	4,4	3,1
	PFE-U3-513	1,5	3,3
	PFE-U3-514	4,1	4,3
	PFE-U3-515	1,1	3,7
20	PFE-U3-711	2,7	3,4
	PFE-U3-712	2,3	3,2
	PFE-U3-713	1,3	3,2

25

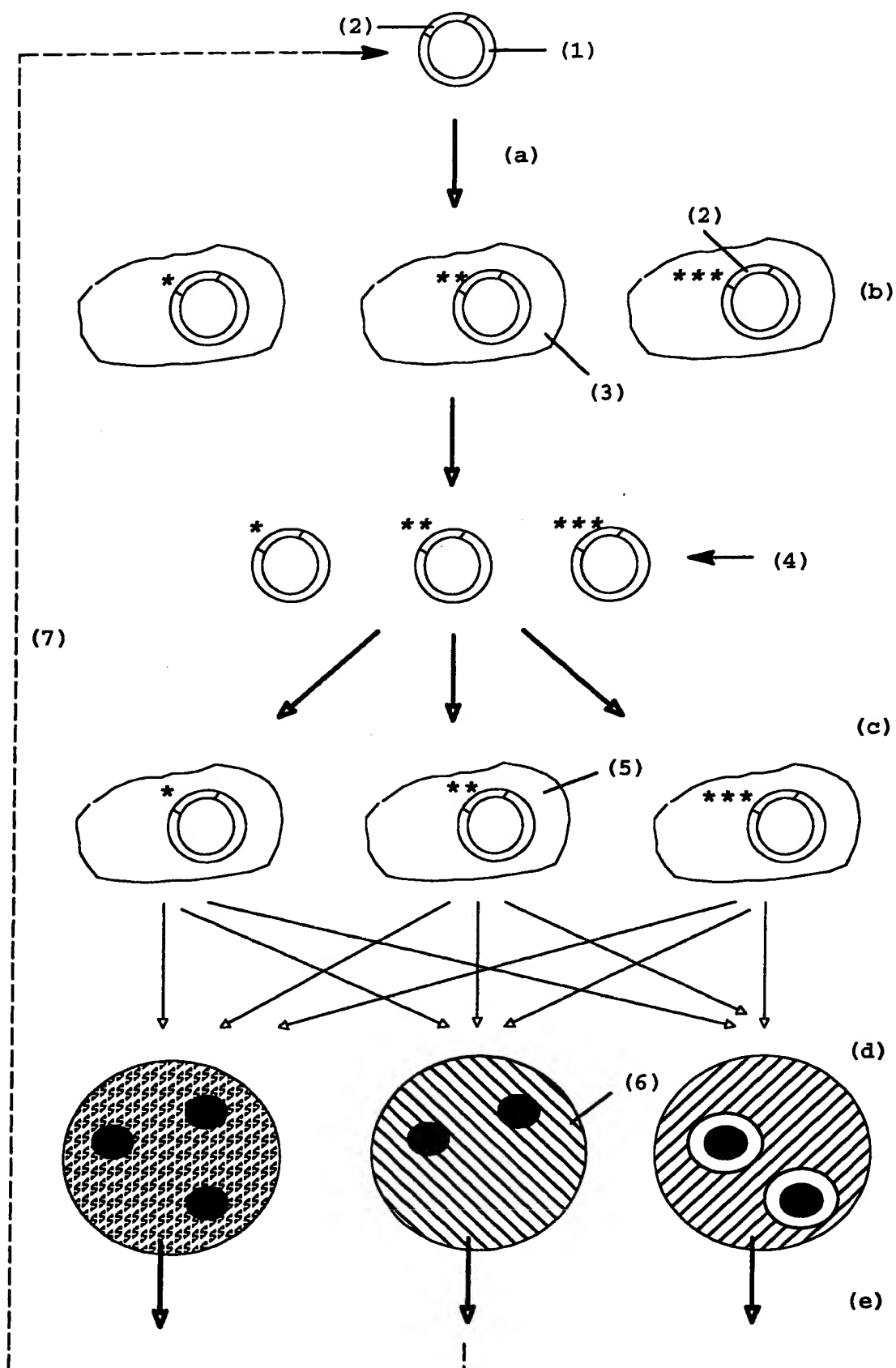
30

35

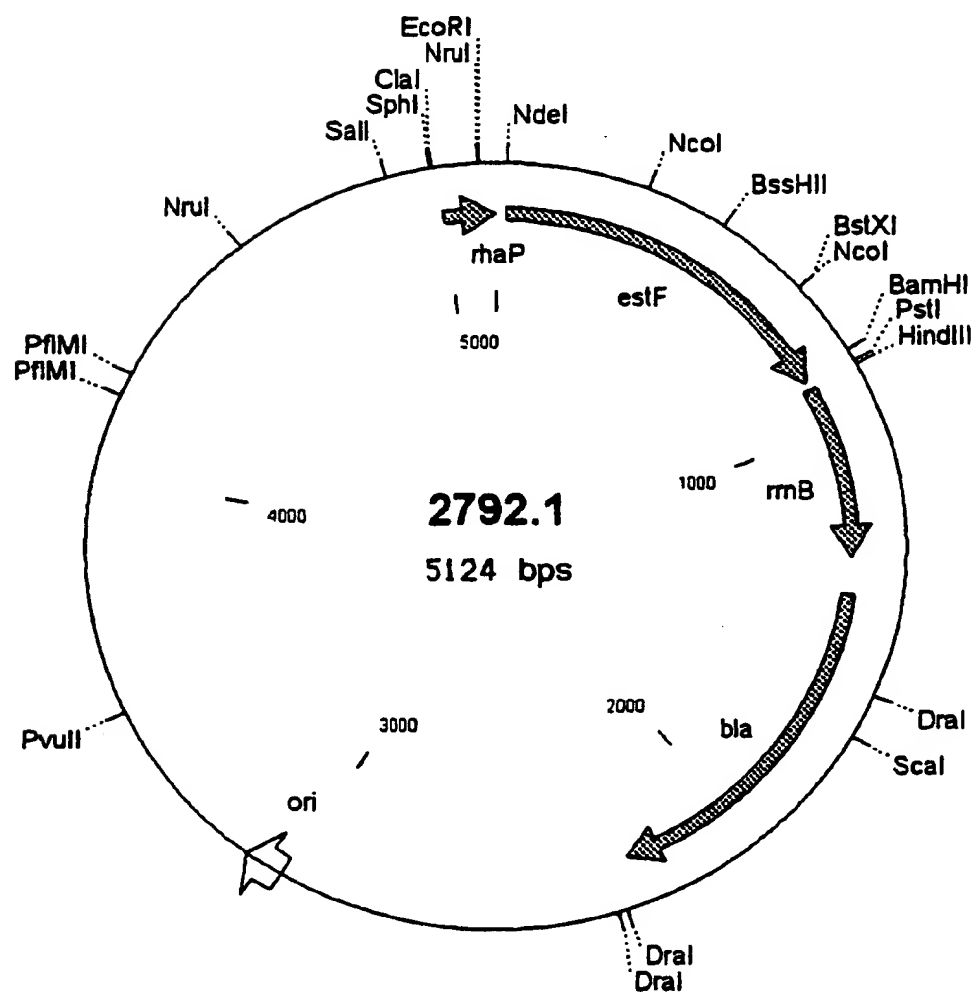
40

45

Figur 1



Figur 2



# Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen

## Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Änderung der Substratspezifität von Enzymen.

10

15

20

25

30

35

40

45